

Efecto de la aplicación de la proteína Harpin $\alpha\beta$ (ProAct®) sobre la incidencia de la clareta, la deformación del fruto y el contenido en Ca^{2+} ligado en variedades de naranja

La clareta (creasing) es una alteración fisiológica que afecta a la piel de los frutos cítricos y se manifiesta en la fase de maduración, sobre todo a partir del cambio de color, observándose unas depresiones en la superficie externa del fruto que le dan un aspecto arrugado y lo deprecian a nivel comercial. El origen de esta alteración no está claramente dilucidado, aunque diversos estudios coinciden en indicar que las principales causas relacionadas con su aparición pueden ser: predisposición genética varietal, estados de déficit nutricionales, especialmente la carencia de calcio, la exposición a estreses abióticos como la sequía y las altas temperaturas durante el cuajado de los frutos. Los elicitors son moléculas que activan rutas de crecimiento y defensa en las plantas, mejorando su estado general y parecen ser una herramienta de acción que podría reducir la incidencia de la clareta. En este estudio preliminar, se ha evaluado el efecto de la aplicación de proteínas Harpin $\alpha\beta$, elicitors vegetales, para combatir la aparición de clareta en frutos de naranjas del grupo navel. Los resultados sugieren una tendencia a reducir la incidencia de clareta e incrementar la firmeza de los frutos, así como un aumento del contenido en calcio ligado en estos frutos.

PALABRAS CLAVE: clareta, bioestimulante, elicitor, naranja, Harpin, citrus.

V. Ibanez, A. Lopez-Garcia, E. Pérez-Román, C. Borredá, M. Talón

Centro de Genómica, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada (Valencia).

INTRODUCCIÓN

La clareta es un desorden fisiológico originado por el colapso y degradación de algunas células constitutivas del albedo, por lo que se crean canales y espacios discontinuos en el tejido esponjoso de la corteza de los frutos, debido a la separación entre el tejido de la lámina media y el albedo (Li y Chen, 2017). La presencia de tejido subepidérmico dañado es la responsable del aspecto arrugado y de la aparición de depresiones en la superficie externa del fruto (Agustí *et al.*, 2012) por lo que se deprecia a nivel comercial, aunque no se observan señales de rotura en el flavedo.

Está admitido que la afección se origina en las primeras fases del desarrollo ya que se distinguen daños a la semana de producirse el cuajado de frutos, aunque los síntomas son más evidentes en la maduración final del fruto. La incidencia de este desorden

varía de año en año e incluso dentro de los frutos de un mismo árbol. Se ha observado que los frutos situados en el interior son más susceptibles que los del exterior; en estos últimos, la cara del fruto más expuesta al sol presenta menos clareta que su opuesta. Diversos factores han sido correlacionados con la aparición de esta afección como son las condiciones climáticas, especialmente sequía y temperaturas elevadas (Gambetta *et al.*, 2002), grosor y firmeza de la corteza de los frutos (Holtzhausen, 1981; Li y Chen, 2017), reguladores del desarrollo (Li *et al.*, 2016) así como el patrón y la variedad (Agustí *et al.*, 2003; Treeby y Storey, 2002). El estrés hídrico da lugar a una menor absorción de minerales tales como el calcio, el boro o el hierro. Reducciones de la aparición de clareta tras aplicaciones con algunos minerales, especialmente con calcio, han sido reportadas (Pham *et al.*, 2012) asociándose esta reducción al

incremento de calcio ligado a pectatos del albedo (Treeby y Storey, 2002). El ácido giberélico (GA3) es el regulador del desarrollo permitido en explotaciones comerciales de cítricos para reducir la aparición de clareta. Su efecto es debido a su reducción en la actividad de la enzima pectina metiltransferasa que da lugar a un mayor incremento de pectina del albedo, molécula presente en la estructura de las paredes celulares, junto con el calcio ligado al mismo, reduciéndose así la incidencia de clareta (Jona *et al.*, 1989).

Actualmente, en las explotaciones comerciales se recomienda emplear pulverizaciones con minerales, especialmente nitrato cálcico y GA3. La respuesta de estos tratamientos es a menudo errática, llegando a reducir, pero no a controlar de forma eficaz la aparición de esta fisiopatía, indicando una causa multifactorial en el origen de la misma.

Las proteínas Harpin $\alpha\beta$, comercializadas como ProAct®, contiene como elemento activo la combinación de 4 dominios proteicos, cada uno con sub-unidades alfa y beta de 4 proteínas Harpin extraídas de 3 bacterias gram negativas: *Erwinia amylovora* (HrpN), *Pseudomonas syringae* (HrpW y HrpZ) y *Ralstonia solanacearum* (PopA) formando una proteína compleja de 412 aminoácidos y un peso molecular de 42 kda. La primera proteína Harpin extraída de *Erwinia amylovora* se describió como una sustancia elicitora capaz de activar diversos procesos fisiológicos en la planta (Wei *et al.*, 1992). ProAct® activa las rutas de crecimiento y defensa frente a estreses (Dong 2004; Iglesias *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018; Livaja *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2001). En relación con aspectos relacionados con la calidad de la piel en cítricos, se ha observado que las aplicaciones de ProAct® en plantaciones comerciales de mandarino incrementan el contenido de calcio total y calcio ligado de la corteza de sus frutos (Marín *et al.*, 2018). Sin embargo, no han sido reportados estudios donde se evalúe la eficacia de ProAct® en la reducción de la aparición de clareta.

En este trabajo se presentan los resultados preliminares sobre el efecto de las proteínas Harpin $\alpha\beta$, comercializadas como ProAct®, para el control de la clareta en variedades de naranjo (*Citrus sinensis* (L.) Osb.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los ensayos se realizaron durante cuatro años, ensayándose cada año en una parcela distinta con árboles en plena producción (Tabla 1). Se emplearon la variedad temprana de naranjo Navelina (*Citrus sinensis* (L.) Osb. 'navelina') los tres primeros años y la variedad tardía Lane late (*Citrus sinensis* (L.) Osb. 'Lane late') el cuarto año, todos ellos injertados sobre patrón Citrange carrizo (*C. sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata* (L.) Raf.).

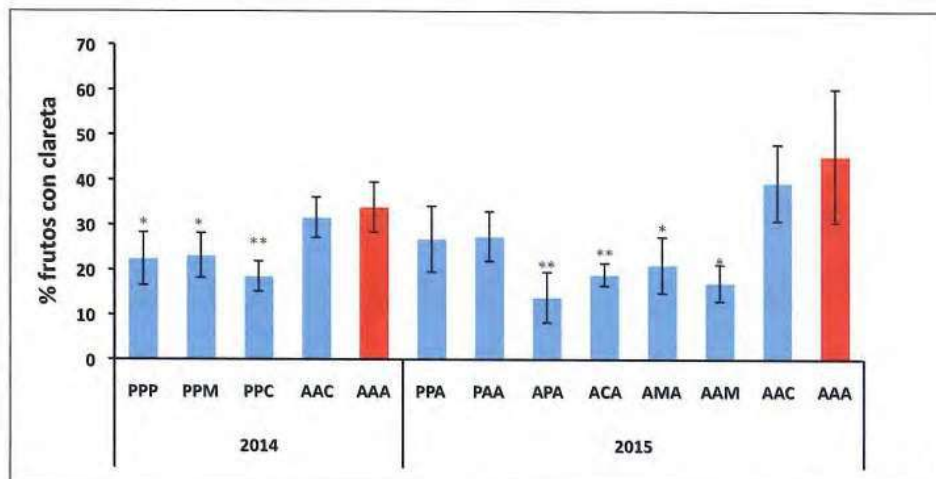


Figura 1. Porcentaje de frutos afectados con clareta en dos parcelas y años independientes de la variedad de naranjo Navelina. Tres aplicaciones correspondientes a los estados fenológicos: caída de pétalos, cuajado y cambio de color. Tratamientos: A = agua; C =convencional (giberélico y nitrato cálcico); P = ProAct®; M = mezcla de ProAct® y convencional (* p-valor < 0,1; ** p-valor < 0,05, t-student. Comparación respecto al control correspondiente de cada año de ensayo, AAA).



Figura 2. Fotografías de frutos de Navelina en cambio de color afectados por clareta el 28 de octubre de 2016 en la localidad de Casinos (Valencia).

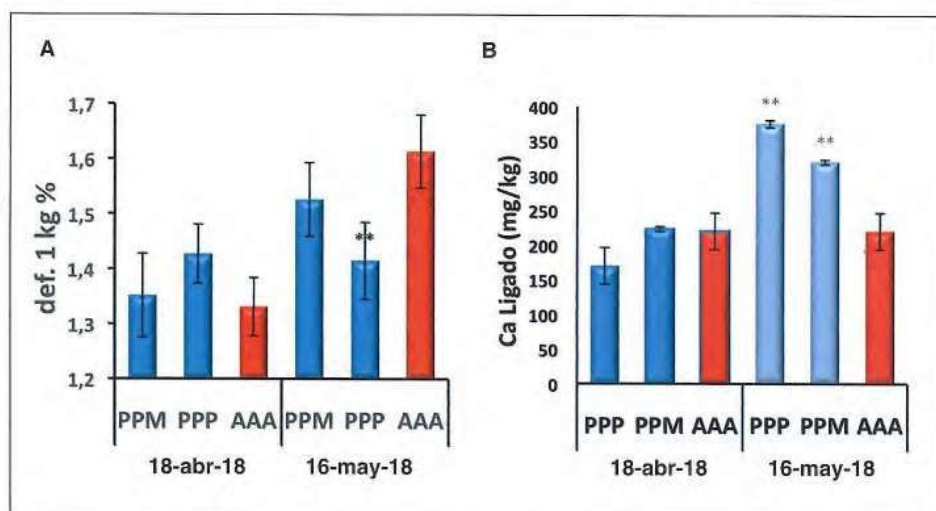


Figura 3. A) Deformación del fruto al aplicar una fuerza constante de 10 N en frutos de Lane late recolectados en estado de sobremaduración (16-mayo-2018). B) Contenido en Calcio ligado a pectatos en la corteza de frutos de Lane late recolectados en el momento de la cosecha comercial (18-abril-2018) y aproximadamente un mes después del mismo (16-mayo-2018) considerándose estado de sobremaduración de los frutos. Frutos pulverizados con ProAct® en caída de pétalos, cuajado y cambio de color (PPP), en caída de pétalos, cuajado y combinado con giberélico y nitrato cálcico en cambio de color (PPM) y frutos control (AAA). (** p-valor < 0,05, t-student. Comparación respecto al control correspondiente de cada fecha de muestreo, AAA).

Tratamientos realizados

Para cada año y parcela se realizaron pulverizaciones foliares del producto comercial ProAct® (300g/Ha), nitrato cálcico (2%) y ácido giberélico (20ppm) o la mezcla de ambos (Tabla 1). Las pulverizaciones se realizaron en tres fechas, correspondiendo a los estadios fenológicos de "caída de pétalos", "cuajado" y "cambio de color". La disolución pulverizada fue realizada empleando como base agua osmotizada, sin mojantes y según los distintos tratamientos a realizar, se adicionaron los productos ProAct®, ácido giberélico (GA3) y Nitrato cálcico en la concentración mencionada, ajustándose a un pH final de 5,7. El tratamiento control consistió en pulverizaciones foliares con agua osmotizada ajustada a un pH final de 5,7 y sin ningún producto adicional.

Evaluación de clareta

El porcentaje de frutos afectados de clareta se determinó mediante inspección visual de todos los frutos de cada árbol tratado. La evaluación se realizó en la fecha de recolección comercial en las dos primeras campañas. El tercer año, clasificado como excepcional en cuanto al elevado porcentaje de aparición de clareta, se evaluó dos semanas antes. El cuarto año, dada la bajísima tasa de afección de frutos con clareta en el momento de la recolección comercial, la determinación se realizó 1 mes posterior a la fecha de recolección. Se evaluó un promedio de 250 frutos por árbol.

Tratamiento estadístico de los datos

Se realizaron comparativas de medias respecto al control mediante la prueba de t de student. En el caso de datos de porcentajes, éstos se transformaron previo al análisis estadístico con la función arcoseno. El número mínimo de datos empleados fue de 4.

Cuantificación de contenido en calcio y firmeza de los frutos

La cuantificación del contenido en calcio se realizó en el laboratorio AGQ Labs España. El análisis se realizó en un plazo máximo de siete días

Tabla 1. Tratamientos realizados para la evaluar el efecto de ProAct® sobre la calidad del fruto de naranja: A = agua; C =convencional (giberélico y nitrato cálcico); P = ProAct®; M = mezcla de ProAct® y convencional acorde a las 3 épocas de aplicaciones: caída de pétalos, cuajado y cambio de color.

Año	Localización parcela	Tratamiento (Caída pétalos, Cuajado fruto, Cambio color)	Variedad	Edad
2014	Montroi	PPP, PPM, PPC, AAC, AAA	Navelina	22
2015	Benifaraig	PPA, PPA, APA, ACA, AMA, AAM, AAC, AAA	Navelina	20
2016	Casinos	APA, AAP, AAM, AAA	Navelina	6
2017/2018	Lliria	PPP, PPM, AAA	Lane late	14

después de la recolección. El contenido total de calcio se determinó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El calcio ligado a pectatos se analizó mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS).

La firmeza de los frutos se determinó mediante un instrumento INSTRON, modelo 2519-104 empleando 18 frutos por tratamiento procedentes de 3 árboles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los dos primeros años se evaluó la eficacia sobre la aparición de clareta en frutos de la variedad Navelina mediante 12 combinaciones de tratamientos de ProAct® y/o Giberélico con Nitrato calcio en 3 estados fenológicos: caída de pétalos, cuajado y cambio de color (Tabla 1).

El porcentaje de frutos afectados con clareta en los árboles control, pulverizados con agua, en 2014 y 2015 fue del 33% y 45%, considerándose una incidencia considerable en términos económicos para el agricultor teniendo en cuenta que estos frutos no pueden ser destinados a su venta en fresco y o bien son desechados o son derivados a la producción de zumos en cuyo caso el precio de venta suele ser inferior.

Durante el primer año los tratamientos PPP, PPM y PPC redujeron la incidencia significativamente (PPP y PPM $p < 0,1$; PPC $p < 0,05$) (Figura 1, año 2014).

Durante el segundo año se observó una tendencia a reducir el porcentaje de frutos afectados por clareta en todos los tratamientos que incluyeron ProAct® si bien, fueron significativos al 95% de confianza los tratamientos APA, ACA y al 90% AMA y AAM (Figura 1, año 2015).

La aplicación de ácido giberélico y nitrato cálcico en el cambio de color (AAC: 2014, 2015, Figura 1) no mostró diferencias en el porcentaje de frutos con clareta respecto al control, pero su combinación con ProAct® (AAM) mostró una reducción media del 62%, valor estadísticamente significativo ($p < 0,10$) (AAM: 2015).

Cuando el tratamiento fue realizado en el cuajado de frutos, procedimiento recomendado por los organismos oficiales, si se observó una reducción significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de frutos afectados (ACA: 2015 Figura 1).

Los resultados obtenidos en los dos primeros años de ensayo de aplicación de ProAct® mostraron una tendencia a la reducción del porcentaje medio de frutos con clareta (Figura 1). Con el objetivo de reducir el número de aplicaciones se planteó realizarlas en cuajado o en cambio de color para que su aplicación coincidiese con la de otros tratamientos agronómicos que son realizados en caso necesario. Así, en el tercer año (2016) se realizaron aplicaciones únicas de ProAct® en cuajado de frutos (APA), en cambio de color (AAP) o combinado con ácido giberélico y nitrato cálcico (AAM). El año 2016 fue considerado como un año excepcional por la elevada incidencia e

intensidad de clareta sobre navelinas. En nuestra parcela de evaluación se empezó a detectar clareta antes del cambio de color (**Figura 2**) y en noviembre, en una fecha anterior a la recolección comercial estimada se evaluó la incidencia de clareta mostrando unos valores de casi el 99% en los árboles control. Los valores de porcentaje de frutos con clareta fueron de 93%, 82%, 79%, en los tratamientos APA, AAM, AAP respectivamente, valores sin diferencia estadística significativa respecto al control.

En relación con la variedad temprana Navelina, los resultados sugieren una tendencia a disminuir la incidencia de clareta en los frutos tratados con pulverizaciones foliares de ProAct® a la dosis de 300 g/Ha en uno o varios de los estados fisiológicos de caída de pétalos, cuajado y cambio de color.

El cuarto año de ensayo empleando la variedad tardía Lane late la incidencia de clareta en la parcela de ensayo fue prácticamente inexistente. Las aplicaciones foliares de ProAct®, en la variedad tardía de naranja Lane late, no mostraron diferencias relevantes en el porcentaje de frutos afectados por clareta. El porcentaje de frutos con clareta fue del 2% en los frutos control, tanto en el momento de la recolección como un mes posterior al mismo, impidiendo la evaluación del efecto de las proteínas Harpin $\alpha\beta$ sobre la clareta. Sin embargo, se observó una tendencia a incrementar la firmeza de los frutos siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) cuantificada como la medida de deformación de los frutos del tratamiento PPP (**Figura 3-A**, 16-may-18). El contenido de calcio ligado a pectatos fue superior al nivel de significancia del 95% respecto al control en los frutos tratados con ProAct® muestreados un mes más tarde al momento de recolección comercial (**Figura 3-B**). El incremento en el contenido de calcio ligado a pectatos en la corteza de mandarino Queen, en condiciones de crecimiento subóptimas, pulverizado foliarmente con ProAct® ha sido descrito previamente (Marín *et al.*, 2018).

Estos resultados sugieren que las aplicaciones de ProAct® parecen favorecer

el incremento en el contenido de calcio ligado a pectatos en la corteza de los frutos y podría estar relacionado con el incremento de la firmeza de los frutos cítricos observada en este estudio.

CONCLUSIÓN

Los resultados observados en los ensayos realizados en la variedad temprana de naranja Navelina con aplicaciones de ProAct® en uno o varios de los estados fisiológicos de caída de pétalos, cuajado y cambio de color sugieren una tendencia a disminuir la incidencia de clareta. En la variedad tardía de naranja Lane late, se observó un incremento en el contenido de calcio ligado en la corteza de los frutos y una tendencia al incremento de la firmeza del fruto maduro. El aumento de la firmeza de los frutos tratados con ProAct® con respecto a los frutos no tratados de Lane late puede ser un factor de calidad, mejorando la aptitud de la fruta para su manipulación en el almacén de confección y posterior comercialización.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la colaboración de Ángel Boix Palanca, Antonio Prieto Mármol e Isabel Sanchís Rom por su inestimable ayuda en la realización de los tratamientos, toma de muestras y análisis de datos.

Este trabajo ha sido elaborado bajo el convenio de colaboración IVIA-Plant Health Care 7523.

BIBLIOGRAFÍA

- Agustí M., Almela V., Juan M., Mesejo C., Martínez-Fuentes A. 2003. Rootstock influence on the incidence of rind breakdown in 'Navelate' sweet orange. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(4), 554-558. <https://doi.org/10.1080/14620316.2003.11511662>
- Dong H.P. 2004. Downstream Divergence of the Ethylene Signaling Pathway for Harpin-Stimulated Arabidopsis Growth and Insect Defense. *Plant Physiology*, 136(3), 3628-3638. <https://doi.org/10.1104/pp.104.048900>
- Gambetta G., Telias A., Arbiza H., Espino M., Franco J., Rivas F., Gravina A. 2002. 'Creasing' En Naranja 'Washington' Navel En Uruguay. Incidencia, Severidad Y Control 'Creasing' in 'Washington' Navel Orange in Uruguay. *Agrociencia*, VI(2), 17-24.

- Holtzhausen L. C. 1981. Creasing: Formulating a hypothesis. In *Proc Int Soc Citricult Congress* (pp. 201-204).
- Iglesias Fuente D.J., Navaza Dafonte J.M., Ibañez V., Talón Cubillo M. 2005. Efecto de las proteínas harpin sobre el desarrollo vegetativo de cítricos de las variedades clementina de nules y nova. *Levante Agrícola: Revista Internacional de Cítricos*, ISSN: 0457-6039, 384-393. Retrieved from <https://www.ediciones-lav.es/categoria-producto/levante-agricola/>
- Jona R., Goren R., Marmora M. 1989. Effect of gibberellin on cell-wall components of creasing peel in mature 'Valencia' orange. *Scientia Horticulturae*, 39(2), 105-115. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90083-6](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90083-6)
- Li J., Chen J. 2017. Citrus Fruit-Cracking: Causes and Occurrence. *Horticultural Plant Journal*, 3(6), 255-260. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.08.002>
- Li J., Liang C., Liu X., Huai B., Chen J., Yao Q., ... Luo X. 2016. Effect of Zn and NAA co-treatment on the occurrence of creasing fruit and the peel development of 'Shatangju' mandarin. *Scientia Horticulturae*, 201, 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.039>
- Li X., Han B., Xu M., Han L., Zhao Y., Liu Z., ... Zhang C. 2014. Plant growth enhancement and associated physiological responses are coregulated by ethylene and gibberellin in response to harpin protein Hpa1. *Planta*, 239(4), 831-846. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2013-y>
- Liu Y., Zhou X., Liu W., Xiong X., Lv C., Zhou X., Miao W. 2018. Functional regions of HpaXm as elicitors with specific heat tolerance induce the hypersensitive response or plant growth promotion in nonhost plants. *Plos One*, 13(1), e0188788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188788>
- Livaja M., Zeidler D., von Rad U., Durner, J. 2008. Transcriptional responses of Arabidopsis thaliana to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology*, 213(3-4), 161-171. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.10.004>
- Manuel A. 2012. Citricultura. Mundi-Prensa.
- Marín A., Staska K., Dillon A. 2018. Mobilising Ca²⁺ to enhance fruit quality - Preharvest application of Harpin $\alpha\beta$ (ProAct®) in citrus orchards in Spain (1).pdf. Montevideo (Uruguay): IV INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CITRUS BIOTECHNOLOGY.
- Pham, T. T. M., Singh, Z., & Behboudian, M. H. 2012. Different surfactants improve calcium uptake into leaf and fruit of 'Washington navel' sweet orange and reduce albedo breakdown. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6), 889-904. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663442>
- Qiu D., Clayton K., Wei Z.M. 2001. Bioassay development for Messenger® activity. *Phytopathology*, S74.
- Treeby M.T., Storey R. 2002. Calcium-spray treatments for ameliorating albedo breakdown in navel oranges. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(4), 495. <https://doi.org/http://doi.org/10.1071/EA00149>
- Wei Z., Laby R., Zumoff C., Bauer D., He S., Collmer A., Beer S. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257(5066), 85-88. <https://doi.org/10.1126/science.1621099>